

Design and evaluation of novel channelrhodopsins with applications in neuroscience

著者	温 磊
号	9
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第208号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60043

	うえん れい
氏名（本籍地）	温 磊
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第 208 号
学位授与年月日	平成 23 年 9 月 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ， 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 (博士課程) 生命機能科学専攻
論 文 題 目	Design and evaluation of novel channelrhodopsins with applications in neuroscience(新世代チャネルロドプシンのデザイン、評価、ならびに神経科学への応用)
博士論文審査委員	(主査) 教 授 八尾 寛 教 授 山元 大輔 准教授 筒井健一郎

論文内容の要旨

Optogenetics is one of cut-edge areas of neuroscience combining molecular biology and optical electrophysiology to achieve gain or loss of function within specifically defined neuronal population. Optogenetic manipulation of a neuronal network enables one to reveal how high-order functions emerge in the central nervous system. As optogenetic actuator, one of the *Chlamydomonas* rhodopsins, channelrhodopsin-1 (ChR1), has several advantages over channelrhodopsin-2 (ChR2) in terms of the fast ON, OFF kinetics, small desensitization, rapid recovery in dark and long wavelength-sensitivity except for insufficient photocurrent. The photocurrent retardation of ChR1 was overcome by exchanging the sixth helix domain with counterpart in ChR2 producing ChR1-*fg*₂ or Channelrhodopsin-green receiver (ChRGR) with further reform of the molecule. The kinetic advantages of novel ChRGR permit to inject a light-evoked current into a neuron by the time course as predicted by the intensity of the shedding light (opto-current clamp). The ChRGR was expressed in the motor cortical neurons of a mouse using Sindbis pseudovirion vectors. When an oscillatory LED light signal was applied sweeping through frequencies, it robustly evoked action potentials synchronized to the oscillatory light at 5-10 Hz in layer 5 pyramidal cells of acute cortical slice. The ChRGR-expressing neurons were also driven in vivo with monitoring local field potentials (LFPs) and the time-frequency energy distribution of the light-evoked responses was investigated using wavelet analysis. The oscillatory light enhanced both the in-phase and out-phase responses of LFP at the preferential frequencies of 5-10 Hz. The spread of activity was evidenced by the fact that there were many c-Fos-immunoreactive neurons that were negative for ChRGR in the region of the motor cortex. The opto-current-clamp study suggests that the depolarization of a small number of neurons wakes up the motor cortical network over some critical point to the activated state.

論文審査結果の要旨

緑藻類の光感受性イオンチャネル（チャネルロドプシン：ChR）を脳のニューロン（神経細胞）に発現させることにより、ニューロンを光で操作することができる。この技術は、オプトジェネティクスとよばれている。従来のオプトジェネティクスには、野生型の ChR2 がおもに用いられてきたが、青色光にのみ応答するという限界があった。これに対して、ChR1 は、より組織を透過しやすい緑色光に対する感受性が高い、脱感作しにくい、応答速度が大きいなどの点において ChR2 に比べ優れているが、光に対する応答（光電流応答）が小さいという欠点があった。本論文は、ChR1 と ChR2 の構造と機能を比較し、第6膜貫通ヘリックスに光電流サイズを制御している構造があること、および、第7膜貫通ヘリックスの一部に吸収波長特性を制御している構造があることを解明した。その結果、ChR1 の優れた特性を残しながら光電流応答の増大したチャネルロドプシンとして、ChRGR を創り出した。ChRGR は、緑色光に応答して大きな光電流応答が得られる、脱感作が小さい、応答速度が大きいなどの点において、オプトジェネティクスに最適化されていた。そこで温磊氏は、ChRGR 遺伝子を組込んだシンドビスウィルスベクターを作成し、マウス大脳皮質運動野ニューロンに感染させた。ついで、緑色 LED を用いて、0.1-100 Hz の周波数を連続的に変化させながら振動する照射光パターン（RSSL）を作成し、麻酔したマウスの脳表面に照射しました。連続ウェーブレット解析により、運動野の局所フィールド電位（LFP）の 3-10 Hz の周波数成分が増大したことを示したが、光入力に同期しない活動も認めた。照射実験後に、前初期遺伝子産物のひとつ c-Fos 発現を免疫組織化学的に検証したところ、ChRGR を発現していないニューロンにおいても、c-Fos の高発現を認めた。すなわち、緑色 LED 光で駆動された少数のニューロンの活動が再帰性ネットワークの創発的な活動レベルを亢進させたことが示唆された。

本研究成果により、光を用いて脳神経細胞を駆動する技術の精度が飛躍的に向上した。また、この技術の応用範囲が拡大した。今後の研究の発展により、目的とする脳神経細胞を、選択的に、その固有の発火パターンで駆動させることで、効率よく外部から信号を入力したり、副作用を少なく脳機能を補完したりする可能性が考えられる。

本論文は、氏が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、温磊氏提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。